

DESCRIPCIÓN

TÍTULO

5 PLANTA TRANSFORMADA QUE TIENE UNA FLOR DE COLOR AZUL Y
MÉTODO PARA CREAR LA MISMA

CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001]

La presente invención hace referencia a un método para la creación de una planta transformada que tiene una tonalidad azul de flor, caracterizado porque hace que la antocianina de tipo delfinidina y una flavona C-glucósido coexistan dentro de las células vegetales, y una planta transformada caracterizada porque la antocianina de tipo delfinidina y una flavona C-glucósido coexisten dentro de las células vegetales, o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos parciales de la planta (especialmente flores cortadas), formas procesadas (especialmente flores cortadas y procesadas), tejidos o células.

ANTECEDENTES

20

[0002]

Las rosas, los crisantemos y los claveles son plantas de importancia industrial en todo el mundo. En particular, las rosas son las plantas con flor más populares, se han cultivado desde antes de Cristo y su reproducción artificial se ha llevado a cabo durante varios cientos de años. Sin embargo, debido al problema de que no hay especies silvestres con una tonalidad azul de flor entre las especies relacionadas que se pueden cruzar, ha sido difícil crear una variedad de rosas con una tonalidad azul de flor mediante la reproducción cruzada convencional o por mutación. La creación de una tonalidad azul de flor completamente nueva estimularía una nueva demanda para las flores a medida que las áreas de su uso se expandan, lo que lleva a una expansión de la producción y el consumo. Por lo tanto, mediante técnicas de ingeniería genética, se ha buscado la producción de rosas que tengan una tonalidad azul de flor.

30

[0003]

Por ejemplo, se sabe que las flores de color púrpura a azul contienen grandes cantidades de antocianinas de tipo delfinidina, como delfinidina, petunidina y malvidina. Sin embargo, las flores como las rosas no pueden producir tales antocianinas de tipo delfinidina, por lo que se han realizado estudios en los que la delfinidina se produce artificialmente mediante la expresión del

35

gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa que es necesario para su síntesis (LNRP 1). Sin embargo, cuando se busca expresar el gen enzimático para producir la sustancia objetivo en una planta recombinante, aun cuando el metabolismo de la planta es alterado artificialmente, ocurre con frecuencia una competencia con enzimas endógenas de la planta misma y, en la mayoría de los casos, la acumulación del producto objetivo no tiene lugar en absoluto o sucede de manera limitada.

[0004]

Además, a parte de la estructura de la antocianina en sí, el color de la flor cambia según los flavonoides coexistentes (denominados copigmentos), los iones metálicos, el pH de la vacuola, etc. Las flavonas y flavonoles son copigmentos típicos que, al ser apilados para intercalar antocianina, tienen el efecto de hacer que la antocianina parezca azul y oscura (LNRP 2). Esto se conoce como efecto de copigmentación. Se sabe que las flavonas en particular exhiben un fuerte efecto de copigmentación. Por ejemplo, se ha informado que los análisis de claveles genéticamente modificados hallaron que las flavonas exhibían un efecto de copigmentación significativo (LNRP 3). Además, se ha informado que en el Iris holandés, cuanto mayor es la proporción del contenido total de la flavona con respecto al contenido total de la delfinidina, mayor es el efecto de copigmentación y el color se vuelve azul (NPL4).

[0005]

Sin embargo, no todas las plantas pueden producir flavona, y las rosas, petunias y similares no acumulan flavona. Por lo tanto, se han hecho intentos para expresar, en tales plantas, genes que codifican proteínas que actúan para sintetizar flavona a partir de flavanona para modificar el color de las flores (LP 1).

[0006]

Además, a parte de la forma libre, la flavona también se distribuye como glucósido, y aunque se produce flavona O-glucósido y flavona C-glucósido, se sabe que la flavona C-glucósido en particular exhibe un fuerte efecto de copigmentación. Por ejemplo, se ha informado que la isovitexina, que es un tipo de flavona C-glucósido, exhibe un efecto de copigmentación con antocianina en el Iris Japonés y al estabilizar la antocianina, se estabiliza también una tonalidad azul de flor (LNRP 5). Con respecto a la flavona C-glucósido, hasta ahora se han descrito dos vías biosintéticas. En una de las vías, la flavona C-glucósido se sintetiza a partir de flavanona mediante reacciones catalizadas por flavanona 2-hidroxilasa y C-glucosiltransferasa y deshidratasa. En la otra vía, la flavona C-glucósido se sintetiza a partir de flavanona mediante reacciones catalizadas por flavona sintasa y flavona C-glucosiltransferasa (LNRP 6).

[0007]

Sin embargo, hasta ahora no ha habido informes de ejemplos en los que estos genes se introduzcan en plantas que no producen flavona C-glucósido. Además, se considera que el efecto

de copigmentación está influenciado por la proporción cuantitativa de la antocianina y flavona, la modificación por grupos de azúcares o de acilo en la antocianina y flavona, etc., y no siempre es posible hacer que el color de la flor sea azul al simplemente expresar el gen de la flavona sintasa y la flavona que se acumula. Cuando el gen de la flavona sintasa de la torenia se expresa en petunias, el color púrpura azulado de la flor se desvanece (LNRP 7). Además, cuando se expresa un gen de flavona sintasa derivado de la *Gentiana scabra* en el tabaco, se sintetiza la flavona (LNRP 8) pero el color de la flor aún se desvanece. Además, ha habido intentos de modificar el color de flor de las rosas al incorporar artificialmente flavona y malvidina (LP 2), pero no se ha logrado con éxito la creación de rosas que tengan una tonalidad azul de flor.

[0008]

De hecho, hasta ahora, en la modificación del color de flor de las rosas que buscan una tonalidad azul de flor, las rosas con un color púrpura (grupo de tonalidades de la tabla de colores RHS: grupo púrpura) o un color púrpura azulado (grupo púrpura-violeta, grupo violeta) fueron los límites y las rosas con flores de un color azul violáceo (grupo violeta-azul) o azul (grupo azul) no se han creado. Por lo tanto, todavía existe la necesidad de desarrollar una técnica de control de expresión del color azul para permitir la creación de rosas con un verdadero color azul de flor.

[LISTA DE REFERENCIAS]

LITERATURA DE PATENTE

[0009]

[LP 1] Solicitud de patente japonesa sin examinar (Kokai) No. 2000-279182

[LP 2] WO2008/156206

[LITERATURA NO RELACIONADA CON PATENTE]

[0010]

[LNRP 1] Tanaka 2006 Phytochemistry Reviews 5, 283-291

[LNRP 2] Goto (1987) Prog. Chem. Org. Natl. Prod. 52

[LNRP 3] Fukui et al. Phytochemistry, 63, 15-23, 2003

[LNRP 4] Mizuno et al. Plant Physiol. Bioch. 2013 72, 116-124

[LNRP 5] Yabuya et al. Euphytica 2000 115, 1-5

[LNRP 6] Sasaki et al. FEBS Lett. 2015 589, 182-187

[LNRP 7] Tsuda et al. Plant Biotechnology, 21, 377-386, 2004

[LNRP 8] Nakatuka et al. 2006, Molecular Breeding 17:91-99

RESUMEN DE LA INVENCION

[PROBLEMA TÉCNICO]

[0011]

El objeto de la presente invención es proporcionar una planta transformada que tenga una tonalidad azul de flor o sus progenies endogámicas o exogámicas, o sus propágulos, cuerpos
5 parciales de la planta (especialmente flores cortadas), formas procesadas (especialmente flores cortadas y procesadas), tejidos o células.

[SOLUCIÓN AL PROBLEMA]

[0012]

10 Los presentes inventores llevaron a cabo una extensa investigación con el fin de resolver el problema anterior y, como resultado de la experimentación repetitiva, descubrieron que una planta transformada que tiene una tonalidad azul de flor (tabla de colores RHS 5ª edición: grupo azul-violeta/grupo azul y/o un ángulo de tonalidad de 339,7° a 270,0°) que no se pudo obtener previamente podría crearse al hacer que una antocianina de tipo delphinidina y una flavona C-
15 glucósido coexistan en el pétalo de las plantas como las rosas, y de este modo cumplir a cabalidad la presente invención.

[0013]

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

- [1] Un método para la creación de una planta transformada caracterizado porque hace que una
20 antocianina de tipo delphinidina y una flavona C-glucósido coexistan en una célula de una planta.
- [2] El método de acuerdo con 1, en donde la flavona C-glucósido se selecciona del grupo que consiste en flavona 6-C-glucósido, flavona 8-C-glucósido y una combinación de las mismas.
- [3] El método de acuerdo con 2, en donde la flavona C-glucósido es apigenina 6-C-glucósido y/o luteolina 6-C-glucósido.
- 25 [4] El método de acuerdo con cualquiera de 1 a 3, en donde la antocianina de tipo delphinidina se selecciona del grupo que consiste en malvidina 3,5-diglucósido, delphinidina 3,5-diglucósido, petunidina 3,5-diglucósido, antocianinas aciladas (por ejemplo, delphinidina 3-(6"-p-coumaroil- β -glucosil) -5- β -glucósido o delphinidina 3-(6"-p-malonil- β -glucosil) -3',5'- β -diglucósido) y sus combinaciones.
- 30 [5] El método de acuerdo con cualquiera de 1 a 4 que comprende transformar una planta huésped con un vector que comprende un gen de flavona sintasa (FNS) o un homólogo del mismo y un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) o un homólogo del mismo.
- [6] El método de acuerdo con 5, en donde el vector comprende además un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un
35 homólogo del mismo.
- [7] El método de acuerdo con 6, en donde:

el gen de FNS o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(1-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19,

(1-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19 en condiciones rigurosas y que

5 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-a),

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

10 (1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c), y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20
15 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c);

el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(2-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21,

20 (2-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-a),

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22,

25 (2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c), y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22
30 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c);

el gen F3'5'H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(3-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

35 (3-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 bajo condiciones rigurosas y que

codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-a),

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

5 (3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c), y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al
10 menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c);

el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(4-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

15 (4-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-a),

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de
20 la SEQ ID NO: 18,

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c), y

25 (4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c).

[8] El método de acuerdo con 7, en donde el gen de CGT o un homólogo del mismo ha agregado
30 al mismo una región no traducida 5' (5'-UTR) derivada del gen de alcohol deshidrogenasa (ADH) de la *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 23).

[9] El método de acuerdo con cualquiera de 1 a 4 que comprende transformar una planta huésped con un vector que comprende un gen de flavanona 2-hidroxilasa (F2H) o un homólogo del mismo, un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) o un homólogo del mismo y un gen de
35 deshidratasa (FDH) o un homólogo del mismo..

[10] El método de acuerdo con 9, en donde el vector comprende además un gen flavonoide 3',5'-

hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo.

[11] El método de acuerdo con 10, en donde:

el gen de F2H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

- 5 (5-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3,
- (5-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-a),
- 10 (5-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- (5-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-c), y
- 15 (5-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-c);
- 20 el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en
- (6-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13,
- (6-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el
- 25 polinucleótido establecido en (6-a),
- (6-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14,
- (6-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la
- 30 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-c), y
- (6-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en
- 35 (6-c);
- el gen de FDH o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(7-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15,

(7-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el

5 polinucleótido establecido en (7-a),

(7-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16,

(7-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la

10 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-c), y

(7-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en

15 (7-c);

el gen F3'5'H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(8-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

(8-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 bajo condiciones rigurosas y que

20 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-a),

(8-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

(8-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos

25 que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-c), y

(8-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10

30 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-c); y

el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(9-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

(9-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases

35 complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el

polinucleótido establecido en (9-a),

(9-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(9-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-c), y

(9-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-c).

[12] Una planta transformada o una progenie endogámica o exogámica de la misma caracterizada porque la antocianina de tipo delphinidina y la flavona C-glucósido coexisten dentro de una célula de la misma.

[13] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 12, en donde la flavona C-glucósido se selecciona del grupo que consiste en flavona 6-C-glucósido, flavona 8-C-glucósido y una combinación de las mismas.

[14] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 13, en donde la flavona C-glucósido es apigenina 6-C-glucósido.

[15] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de 12 a 14, en donde la antocianina de tipo delphinidina se selecciona del grupo que consiste en malvidina 3,5-diglucósido, delphinidina 3,5-diglucósido, petunidina 3,5-diglucósido y antocianinas aciladas (por ejemplo, delphinidina 3-(6"-p-coumaroil- β -glucosil)-5- β -glucósido o delphinidina 3-(6-p-malonil- β -glucosil)-3',5'- β -diglucósido) y sus combinaciones.

[16] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de 12 a 15 que comprende un gen de flavona sintasa (FNS) o un homólogo del mismo y un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) o un homólogo del mismo.

[17] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 16 que comprende además un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo.

[18] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 17, en donde: el gen de FNS o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(1-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19,

(1-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el

polinucleótido establecido en (1-a),

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c), y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c);

el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(2-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21,

(2-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-a),

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22,

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c), y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c);

el gen F3'5'H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(3-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

(3-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-a),

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos

que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c), y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c); y

el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(4-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

(4-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-a),

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c), y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c).

[19] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 18, en donde el gen de CGT o un homólogo del mismo ha agregado al mismo una región no traducida 5' (5'-UTR) derivada del gen de alcohol deshidrogenasa (ADH) de la *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 23).

[20] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de 12 a 15 que comprende un gen de flavanona 2-hidroxilasa (F2H) o un homólogo del mismo, un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) o un homólogo del mismo y un gen de

deshidratasa (FDH) o un homólogo del mismo.

[21] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 20 que comprende además un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo.

[22] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con 21, en donde: el gen de F2H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(5-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3,

- (5-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-a),
- 5 (5-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- (5-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína
- 10 codificada por el polinucleótido establecido en (5-c), y
- (5-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-c);
- 15 el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en
- (6-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13,
- (6-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el
- 20 polinucleótido establecido en (6-a),
- (6-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14,
- (6-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la
- 25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-c), y
- (6-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en
- 30 (6-c);
- el gen de FDH o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en
- (7-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15,
- (7-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15 bajo condiciones rigurosas y que
- 35 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-a),

(7-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16,

(7-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la

5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-c), y

(7-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en

10 (7-c);

el gen F3'5'H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(8-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

(8-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 bajo condiciones rigurosas y que

15 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-a),

(8-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

(8-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la

20 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-c), y

(8-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10

25 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-c); y

el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(9-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

(9-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 bajo condiciones rigurosas y que

30 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-a),

(9-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

35 (9-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-c), y

(9-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-c).

[23] La planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de 12 a 22 que tiene un color de flor en el grupo azul o grupo violeta-azul de la tabla de colores RHS y/o un ángulo de tonalidad de 339,7° a 270° en el sistema de color CIE L*a*b*.

[24] Un propágulo, una parte de una planta, un tejido o una célula de la planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23.

[25] Una flor cortada de la planta transformada o su progenie endogámica o exogámica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 23, o un producto procesado creado a partir de la flor cortada.

[26] Un vector que comprende un gen de flavona sintasa (FNS) o un homólogo del mismo y un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) o un homólogo del mismo.

[27] El vector de acuerdo con 26 que comprende además un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo.

[28] El vector de acuerdo con 27, en donde:

el gen de FNS o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(1-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19,

(1-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO:19 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-a),

(1-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20,

(1-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c), y

(1-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (1-c);

el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(2-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21,

(2-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO:21 en condiciones rigurosas y que

5 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-a),

(2-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22,

(2-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la
10 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c), y

(2-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22

15 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-c);

el gen F3'5' o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(3-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

(3-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases
20 complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 en condiciones rigurosas y que

codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-a),

(3-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

(3-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la
25 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c), y

(3-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10

30 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (3-c);

el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(4-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

(4-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases
35 complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 en condiciones rigurosas y que

codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-a),

(4-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

5 (4-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c), y

(4-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al
10 menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (4-c).

[29] El vector de acuerdo con 28, en donde el gen de CGT o un homólogo del mismo ha agregado al mismo una región no traducida 5' (5'-UTR) derivada del gen de alcohol
15 deshidrogenasa (ADH) de la *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 23).

[30] Un vector que comprende un gen de flavanona 2-hidroxilasa (F2H) o un homólogo del mismo, un gen de flavona C-glucósido (CGT) o un homólogo del mismo y un gen de deshidratasa (FDH) o un homólogo del mismo..

[31] El vector de acuerdo con 30 que comprende además un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa
20 (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo.

[32] El vector de acuerdo con 31, en donde:

el gen de F2H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(5-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3,

25 (5-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-a),

(5-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de
30 la SEQ ID NO: 4,

(5-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-c), y

35 (5-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4

y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (5-c);

el gen de CGT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(6-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13,

5 (6-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-a),

10 (6-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14,

(6-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-c), y

15 (6-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-c);

el gen de FDH o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

20 (7-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15,

(7-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-a),

25 (7-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16,

(7-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-c), y

30 (7-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (7-c);

35 el gen F3'5'H o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(8-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9,

(8-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 bajo condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-a),

5 (8-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10,

(8-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína
10 codificada por el polinucleótido establecido en (8-c), y

(8-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (8-c); y

15 el gen de MT o su homólogo se selecciona del grupo que consiste en

(9-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17,

(9-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el

20 polinucleótido establecido en (9-a),

(9-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18,

(9-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína
25 codificada por el polinucleótido establecido en (9-c), y

(9-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (9-c).
30

[33] Un polinucleótido aislado seleccionado del grupo que consiste en::

(6-a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13;

(6-b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13 en condiciones rigurosas y que
35 codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-a);

(6-c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

(6-d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la
5 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (6-c), y

(6-e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en
10 (6-c).

[EFECTOS VENTAJOSOS DE LA INVENCION]

[0014]

De acuerdo con la presente invención, se pudo crear una variedad de plantas con una
15 tonalidad azul de flor (tabla de colores RHS 5ª edición: grupo azul-violeta/grupo azul y/o un ángulo de tonalidad de 339,7° a 270,0°) que no se podía obtener previamente.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0015]

[FIG. 1] ilustra las vías biosintéticas de la flavona C-glucósido en plantas.

[FIG. 2] ilustra la estructura del pSPB6486.

[FIG. 3] ilustra la estructura del pSPB7013.

[0016]

La presente invención es un método para la creación de una planta transformada que tiene una tonalidad azul de flor y hace referencia a un método caracterizado porque hace que la antocianina de tipo delfinidina y la flavona C-glucósido coexistan dentro de las células vegetales.

[0017]

30 Las antocianinas son un grupo de pigmentos que existen ampliamente en las plantas y que se sabe que exhiben colores rojo, azul y violeta de flor. Dependiendo del número de grupos hidroxilo en el anillo B del sitio de antocianidina, que es una aglicona, las antocianidinas se clasifican en los tres grupos pelargonidina, cianidina y delfinidina. El cromóforo es la fracción aglicona y las antocianinas a base de pelargonidina exhiben un color rojo brillante, las
35 antocianinas a base de cianidina exhiben un color rojo púrpura y las antocianinas a base de delfinidina exhiben un color rojo púrpura. Aquí, por ejemplo, la “antocianina a base de

delfinidina” puede referirse a delfinidina, malvidina, petunidina o sus derivados, pero preferiblemente es malvidina.

[0018]

Las antocianinas de tipo delfinidina, cuando se hacen coexistir con sustancias como las flavonas, las flavanoles, los ésteres orgánicos y taninos, pueden desarrollar un color azulado debido a las interacciones intermoleculares con las mismas. Este fenómeno se denomina copigmentación y las sustancias que inducen tales fenómenos se denominan copigmentos. La copigmentación no solo tiene el efecto de profundizar el color para inducir la aparición de un color azul, sino que también tiene el efecto de oscurecer los colores y mejorar la estabilidad del color. En esta oportunidad, los presentes inventores confirmaron que los pétalos de rosa desarrollaron un color azul debido al efecto de copigmentación de la antocianina de tipo delfinidina y la flavona C-glucósido.

[0019]

La flavona, que es un tipo de compuesto orgánico, es una cetona cíclica de un derivado de flavan que existe en las plantas principalmente como un glucósido. En un sentido más preciso, la flavona es 2,3-didehidroflavan-4-ona y es un compuesto con la fórmula química $C_{15}H_{10}O_2$ y un peso molecular de 222,24. Sin embargo, la flavona en el sentido más amplio (grupo de flavonas) es solo una categoría de flavonoides y los flavonoides que tienen una estructura de flavona como esqueleto básico y que no tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 se clasifican como “flavonas”. En este documento, la “flavona C-glucósido” se refiere a las flavonas en el sentido amplio del término, y de entre los glucósidos de derivados de flavona, específicamente a glucósidos con aglicona unida directamente al carbono anomérico de la aldosa. Ejemplos de flavona C-glucósido incluyen luteolina C-glucósido, tricetina C-glucósido, apigenina C-glucósido y acacetina C-glucósido, pero no se limitan a los mismos. La flavona C-glucósido también incluye glucósidos de apigenina, luteolina, tricetina y derivados de acacetina. En las plantas se conocen dos vías biosintéticas de flavona C-glucósido (FIG. 1). En la vía 1, la flavona 6-C-glucósido y la flavona 8-C-glucósido se producen a través de la acción de la flavanona 2-hidroxilasa (F2H), una flavona C-glucosiltransferasa (CGT) y una deshidratasa (FDH). En la vía 2, la flavona 6-C-glucósido se produce a través de la acción de la flavona sintasa (FNS) y una flavona C-glucosiltransferasa (CGT). Es preferible que la flavona C-glucósido se seleccione del grupo que consiste en flavona 6-C-glucósidos, flavona 8-C-glucósidos y sus combinaciones. Ejemplos de las mismas incluyen apigenina 6-C-glucósido (isovitexina), apigenina 8-C-glucósido (vitexina), luteolina 6-C-glucósido (isoorientina), luteolina 8-C-glucósido (orientina) y sus derivados.

[0020]

La acumulación de flavona C-glucósido dentro de las células vegetales se puede lograr al

transformar una planta huésped con un vector que contiene genes que son esenciales para la vía 1 (es decir, un gen de flavanona 2-hidroxilasa (F2H), un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT) y un gen de deshidratasa (FDH)) o un homólogo de los mismos, o un vector que contiene genes que son esenciales para la vía 2 (a saber, un gen de flavona sintasa (FNS) y un gen de flavona C-glucosiltransferasa (CGT)) o sus homólogos.

[0021]

La fuente del gen de F2H, que es un gen esencial en la vía 1, o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3;
- (b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 3 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);
- (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
- (d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c); y
- (e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

[0022]

La fuente del gen de CGT, que es un gen esencial en la vía 1, o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen de CGT, modificado con el uso del codón, derivado de la *Oryza sativa* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13;
- (b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 13 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);

(c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c); y

(e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

[0023]

La fuente del gen de FDH, que es un gen esencial en la vía 1, o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un *gen de FDH* derivado de la *Lotus japonicu* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15;

(b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 15 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);

(c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16;

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c); y

(e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

[0024]

La fuente del gen de FNS, que es un gen esencial en la vía 2, o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen de FNS derivado de la *Torenia* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19;

(b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);

5 (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20;

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína
10 codificada por el polinucleótido establecido en (c); y

(e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

15 **[0025]**

La fuente del gen de CGT, que es un gen esencial en la vía 2, o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen de CGT derivado de la *Gentiana scabra* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

20 (a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21;

(b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 21 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (2-a);

25 (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22;

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína
30 codificada por el polinucleótido establecido en (2-c); y

(e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

35 **[0026]**

De preferencia, se desea que al gen de CGT, que es un gen esencial en la vía 2, o a un

homólogo del mismo, se agregue una región no traducida 5' (5'-UTR) derivada del gen de alcohol deshidrogenasa (ADH) de la *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 23).

[0027]

La acumulación de una antocianina de tipo delfinidina dentro de las células vegetales se puede lograr al incorporar un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) o un homólogo del mismo y un gen de metiltransferasa (MT) o un homólogo del mismo en una planta huésped (LP 2). Por lo tanto, se puede hacer que la antocianina de tipo delfinidina y la flavona C-glucósido coexistan con células de una planta huésped al transformar la planta huésped con un vector que contiene además un gen F3'5'H o un homólogo del mismo y un gen de MT o un homólogo del mismo, además de los genes esenciales para las vías 1 y 2 y sus homólogos.

[0028]

La fuente del gen F3'5'H o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen F3'5'H derivado de la *Campanula* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9;
- (b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 9 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);
- (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
- (d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c); y
- (e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

[0029]

La fuente del gen de MT o un homólogo del mismo, no está particularmente limitada siempre y cuando se exhiba la función deseada, pero es preferiblemente un gen de MT derivado de la *Torenia* o un homólogo del mismo que comprende un polinucleótido seleccionado del siguiente grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que consiste en la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17;

(b) un polinucleótido que hibrida con un polinucleótido que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 17 en condiciones rigurosas y que codifica una proteína que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (a);

5 (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18;

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína
10 codificada por el polinucleótido establecido en (c);

(e) un polinucleótido que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y que tiene la misma actividad que una proteína codificada por el polinucleótido establecido en (c).

15 **[0030]**

En la presente descripción, el término “nucleótido” se refiere a ADN o ARN. Aquí, el término “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones que permiten una unión específica, selectiva y detectable, de polinucleótidos u oligonucleótidos al ADN genómico. Las condiciones rigurosas se definen de acuerdo con una combinación apropiada de la concentración de sal, la
20 temperatura del solvente orgánico (por ejemplo, formamida) y otras condiciones públicas conocidas. Es decir, la rigurosidad se aumenta dependiendo de si la concentración de sal se disminuye, la concentración de solvente orgánico se aumenta o la temperatura de hibridación se aumenta. Además, las condiciones de lavado después de la hibridación también se ven afectadas por la rigurosidad. Estas condiciones de lavado se definen de acuerdo con la concentración y
25 temperatura de la sal, y la rigurosidad del lavado aumenta dependiendo de si la concentración de sal se disminuye o la temperatura se aumenta. Por lo tanto, el término “condiciones rigurosas” significa condiciones bajo las cuales toma lugar la hibridación específica solo cuando las secuencias de bases tienen una identidad de secuencia alta donde el grado de “identidad de secuencia” entre cada secuencia de base es, por ejemplo, como un promedio para toda la
30 secuencia, al menos aproximadamente del 80 %, preferiblemente al menos aproximadamente del 90 %, más preferiblemente al menos aproximadamente del 95 %, incluso más preferiblemente al menos del 97 % y lo de mayor preferencia del 98 %. Un ejemplo de “condiciones rigurosas” son una temperatura de 60 °C a 68 °C, una concentración de sodio de 150 a 900 mM, preferiblemente de 600 a 900 mM, un pH de 6 a 8 y, como ejemplo específico, la hibridación se
35 puede llevar a cabo bajo condiciones que incluyen 5 × SSC (NaCl de 750 mM, citrato trisódico de 75 mM), 1% de SDS, 5 × solución de Denhardt, 50 % de formaldehído a 42 °C, y se puede

llevar a cabo el lavado en condiciones que incluyen $0,1 \times \text{SSC}$ (NaCl de 15 mM. Citrato trisódico de 1,5 mM), 0,1 % de SDS y 55 °C.

[0031]

La hibridación puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos públicos conocidos en el arte, tales como el método divulgado en “*Current Protocols in Molecular Biology*” (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987) o métodos basados en el mismo. Además, cuando se usan bibliotecas disponibles en el mercado, la hibridación se puede realizar al seguir el método que se describe en el manual de instrucciones adjunto. Los genes seleccionados por tales métodos de hibridación pueden derivarse de la naturaleza y pueden ser un gen derivado de una planta o un gen que no se deriva de una planta. Además, los genes seleccionados por hibridación pueden ser ADNc, ADN genómico o ADN sintetizado químicamente.

[0032]

“Una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos” significa una secuencia de aminoácidos, en la que, por ejemplo, cualquier número de aminoácidos de 1 a 20, preferiblemente de 1 a 5 y más preferiblemente de 1 a 3, se ha eliminado, sustituido, insertado y/o agregado. La mutagénesis dirigida al sitio, que es un método de ingeniería genética, es útil para introducir mutaciones específicas en sitios específicos y se puede realizar al seguir el método descrito en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Al expresar este ADN mutante con el uso de un sistema de expresión adecuado, se puede obtener una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que incluye delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos.

Además, los polinucleótidos se pueden obtener mediante métodos públicos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, se pueden emplear métodos de síntesis química como el método de fosforamidita o los métodos de amplificación de ácido nucleico que usan cebadores diseñados con base en la secuencia de nucleótidos del gen objetivo que usa una muestra de ácido nucleico vegetal como plantilla para obtener el polinucleótido.

[0033]

Aquí, el término “identidad de secuencia” se refiere a la cantidad (número) de residuos de aminoácidos o nucleótidos que componen secuencias de polipéptidos (o secuencias de aminoácidos) o secuencias de polinucleótidos (o secuencias de nucleótidos), que se puede determinar que son idénticas entre las dos cadenas, y se refiere al grado de correlación de secuencia entre dos secuencias de polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos. La “identidad de secuencia” se puede calcular fácilmente. Se conocen muchos métodos para medir la identidad de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o secuencias de polipéptidos y el término “identidad de secuencia” es bien conocido por un experto en la materia (por ejemplo,

consulte Lesk, A. M. (Ed.), Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, D. W. (Ed.), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin, A. M. & Griffin, H. G. (Ed.), Computer Analysis of Sequence Data: Part I, Human Press, New Jersey, (1994); von Heinje, G., Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, New York, (1987); Gribskov, M. & Devereux, J. (Ed.), Sequence Analysis Primer, M-Stockton Press, New York, (1991)).

[0034]

Además, el valor de la “identidad de secuencia” en el presente documento puede ser un valor que se calcula con el uso de un programa de búsqueda de identidad de secuencia público conocido por una persona experta en la materia, a menos que se especifique lo contrario, y es preferiblemente un valor que se calcula con el uso del programa Clustal W de la aplicación MacVector (versión 9.5 Oxford Molecular Ltd., Oxford, Inglaterra). En la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre cada secuencia de aminoácidos es, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 %, preferiblemente al menos aproximadamente 95 %, más preferiblemente al menos aproximadamente 97 % y lo de mayor preferencia al menos aproximadamente 98 %.

[0035]

El polinucleótido de la presente invención (ácido nucleico, gen) “codifica” una proteína de interés. Aquí, el término “codificar” significa expresar la proteína de interés para que se encuentre en un estado activo. “Codificar” también puede referirse tanto a la codificación de una proteína mediante una secuencia estructural continua (exones) como a través de secuencias intermedias (intrones).

[0036]

La secuencia de un gen que comprende una secuencia de bases nativa se puede obtener mediante análisis con el uso de un secuenciador de ADN. Además, el ADN que codifica una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos modificada puede sintetizarse mediante mutagénesis convencional dirigida al sitio o PCR con base en el ADN que tiene la secuencia de bases nativa. Por ejemplo, se obtiene un fragmento de ADN modificado al tratar el ADN nativo o el ADN genómico con una enzima de restricción, este fragmento se usa como plantilla y la mutagénesis dirigida al sitio o PCR se lleva a cabo utilizando un cebador en el que se ha introducido una mutación deseada y se obtiene el fragmento de ADN modificado que se desea. A partir de entonces, el fragmento de ADN en el que se ha introducido esta mutación se puede unir a un fragmento de ADN que codifica una porción diferente de la enzima objetivo.

Alternativamente, para obtener ADN que codifica una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos acortada, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos más larga que la secuencia de aminoácidos objetivo, el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa se corta con un enzima de restricción deseada, y si como resultado de ello, el

fragmento de ADN no codifica la secuencia de aminoácidos completa, se puede sintetizar y unir un fragmento de ADN que codifica la secuencia deficiente.

[0037]

Además, el polinucleótido obtenido puede expresarse en *E.coli* o sistemas de expresión
5 génica de levadura, y al medirse la actividad enzimática se puede confirmar si el polinucleótido
obtenido codifica una proteína que tiene la actividad deseada.

[0038]

La presente invención también se refiere a vectores (recombinantes) que comprenden el
polinucleótido anterior, especialmente vectores de expresión, así como plantas transformadas por
10 los vectores.

[0039]

Además, los vectores de la presente invención contienen una región de control de
expresión, por ejemplo, un promotor, un terminador o un origen de replicación que depende del
tipo de planta huésped en la que se introduce el vector. Ejemplos de promotores que expresan
15 constitutivamente polinucleótidos dentro de las células vegetales incluyen el promotor 35S del
virus del mosaico de la coliflor, el promotor El₂35S que une dos dominios potenciadores del
promotor 35S, el promotor del gen rd29A, el promotor rbcS, el promotor mac-1, etc. Además,
para la expresión génica específica de tejido, se pueden usar promotores para los genes que se
expresan específicamente en el tejido.

[0040]

Los vectores se pueden producir de acuerdo con métodos convencionales tales como el
uso de enzimas de restricción y ligasas. La transformación de la planta huésped con un vector
también se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos convencionales.

[0041]

Bajo el presente estado de la técnica, se pueden usar técnicas para introducir un
polinucleótido en una planta y para expresar este polinucleótido de manera constitutiva o de
manera específica en el tejido. La introducción de ADN en una planta se puede llevar a cabo
mediante un método público conocido por un experto en la materia, por ejemplo, el método de
agrobacterias, el método de vector binario, el método de electroporación, el método de PEG o el
30 método de pistola de partículas.

[0042]

Las plantas que se pueden usar como huéspedes en la presente invención no están
particularmente limitadas, pero se pueden usar plantas del género *Rosa* en la familia *Rosaceae*, el
género *Chrysanthemum* en la familia *Asteraceae* y el género *Dianthus* en la familia
35 *Caryophyllaceae* (por ejemplo, clavel), y particularmente de preferencia la rosa cultivada
(nombre científico: *Rosa hybrida*) del género *Rosa* en la familia *Rosaceae*. El término “planta de

rosa” que se emplea en el presente documento se refiere a la rosa cultivada (nombre científico: *Rosa hybrida*) del género *Rosa* en la familia *Rosaceae*. Las rosas se dividen principalmente en té híbrido, floribunda, polianta, etc., pero solo hay dos tipos de pigmento principal (antocianina) contenidos en los pétalos de cada una de las cepas, a saber, cianidina y pelargonidina. La variedad de la planta de rosa utilizada como huésped en la presente invención no está particularmente limitada y estas variedades y cepas pueden usarse según sea apropiado. Por ejemplo, las variedades de rosas que se pueden usar como huésped pueden incluir *Ocean Song*, *Noblesse*, *Rita Perfumera*, *Cool Water*, *Fame*, *Topless*, *Peach Avalanche*, etc.

[0043]

De acuerdo con la presente invención, se puede obtener una planta transformada que tiene una tonalidad azul de flor, en donde se puede hacer que una antocianina de tipo delfinidina y una flavona C-glucósido coexistan dentro de las células, en donde la planta transformada preferiblemente es del género *Rosa* de la familia *Rosaceae*, el género *Chrysanthemum* en la familia *Asteraceae* y el género *Dianthus* en la familia *Caryophyllaceae* (por ejemplo, clavel), y particularmente de preferencia la planta de rosa. La planta transformada obtenida tiene un color de flor que pertenece al grupo azul o al grupo azul-violeta de la tabla de colores RHS y/o un ángulo de tonalidad de 339,7° a 270,0° en el sistema de color CIE L*a*b*.

[0044]

La presente invención también se refiere a: una flor cortada de la planta transformada obtenida anteriormente, o una progenie endogámica o exogámica de la misma; un propágulo de la misma; una parte de la planta; tejido; o célula; o un producto procesado producido a partir de la flor cortada (particularmente flores cortadas y procesadas). Las flores cortadas y procesadas incluyen flores prensadas, flores preservadas, flores secas, productos sellados con resina, etc. pero no se limitan a los mismos.

[0045]

La presente invención se describe específicamente en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

[0046]

[Ejemplo 1: Simulación del efecto de copigmentación entre la antocianina y la flavona C-glucósido]

Se prepararon antocianina y flavona C-glucósido para realizar una simulación del efecto de copigmentación entre la antocianina y la flavona C-glucósido. La malvina (malvidina 3,5-diglucósido) y la isovitexina (apigenina 6-C-glucósido) utilizadas en este experimento se compraron de Funakoshi Corporation.

Con respecto a la antocianina (malvina) obtenida de ese modo, se añadió flavona C-glucósido (isovitexina) a relaciones de concentración molar de 0, 2 y 4 equivalentes en un tampón de pH 4,5, y se midió el espectro de absorción. Se hizo que la concentración de antocianina fuera 0,5 mM.

- 5 Al agregar la flavona C-glucósido, la absorbancia de la solución acuosa de antocianina aumentó y la absorbancia máxima (λ máx.) cambió a una longitud de onda más larga con la adición de la flavona C-glucósido. Esto confirma que la isovitexina exhibe un efecto de copigmentación cuando se combina con la malvina.

[0047]

- 10 [Tabla 1]

Absorción máxima (λ máx.) de la solución acuosa de antocianina cuando se agrega flavona C-glucósido

	0 Equivalentes	2 Equivalentes	4 Equivalentes
Malvina (malvidina-3,5-diglucósido)	531,8nm	566,4nm	573,0nm

[0048]

- 15 [Ejemplo 2: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado del pensamiento, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado de la *Glycyrrhiza* en la variedad de *Rosa* “*Rita Perfumera*”]

El pSPB4743 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 4 casetes de expresión.

- 20 (1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado del pensamiento, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:1) y terminador D8
 (2) promotor 35S, F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3), y el terminador AT derivado de la *Perilla*
 (3) promotor 35S, CGT derivado de la *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 5), y el terminador AT derivado de la *Perilla*
 25 (4) promotor 35S, FDH derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 7), y el terminador AT derivado de la *Perilla*

- Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 del pensamiento, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT de la *Oryza sativa* y el gen de FDH de la *Glycyrrhiza* en la planta.
- 30

El pSPB4743 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa naranja “*Rita Perfumera*” y se obtuvo un total de 16 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 15 acumulaban delfinidina, y el contenido máximo de delfinidina fue del 94 % (promedio del 89,5 %). Además, en 10 de los transformantes se confirmó

isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue de 0,55 mg.

[0049]

Los valores analizados de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 2

5 [Tabla 2]

Planta No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C-glucósido (mg/g)
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	IVX
Huésped	0,0%	0,000	0,009	0,013	0,000	0,019	2,109	0,000	0,000	0,000	0,000
1	87,8%	0,967	0,134	0,001	0,318	0,135	0,392	0,000	0,000	0,000	0,255
2	84,5%	0,772	0,138	0,004	0,602	0,245	1,326	0,000	0,000	0,000	0,029
3	85,6%	0,810	0,137	0,000	0,044	0,019	0,046	0,000	0,000	0,000	0,033
4	92,3%	1,289	0,108	0,000	0,478	0,111	0,239	0,000	0,005	0,000	0,232
5	92,4%	1,146	0,092	0,002	0,759	0,199	1,218	0,000	0,003	0,007	0,171
6	93,0%	1,683	0,127	0,000	1,034	0,242	0,318	0,000	0,003	0,000	0,208
7	90,9%	0,929	0,091	0,003	0,518	0,149	0,994	0,000	0,000	0,000	0,000
8	91,7%	0,836	0,070	0,005	0,367	0,115	1,807	0,000	0,004	0,014	0,225
9	94,0%	1,222	0,078	0,000	0,674	0,151	0,242	0,000	0,021	0,039	0,547
10	92,2%	1,116	0,095	0,000	0,561	0,134	0,256	0,000	0,012	0,018	0,213
11	83,9%	1,318	0,251	0,002	0,353	0,174	0,311	0,000	0,000	0,000	0,000
12	85,7%	0,131	0,020	0,002	0,068	0,040	1,017	0,013	0,027	0,204	0,091

Huésped: Rita Perfumera

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovitexina

10 Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0050]

[Ejemplo 3: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado del pensamiento, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado de la *Glycyrrhiza* en la variedad de *Rosa* “Noblesse”]

15 El pSPB4743, que se construyó de la misma manera que para el Ejemplo 2, se introdujo en una variedad de rosa rosa “Noblesse” y se obtuvo un total de 20 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que todos acumulaban delfinidina, y el contenido máximo de delfinidina fue del 88 % (promedio del 83,5 %). Además, en 18 de los transformantes se confirmó isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima producida por gramo de
20 pétalos frescos fue de 0,06 mg.

[0051]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 3.

[Tabla 3]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g)
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	IVX
Hués ped	0,0%	0,020	0,040	0,000	0,000	0,012	1,430	0,000	0,000	0,000	0,000
1	85,1%	1,127	0,196	0,003	0,320	0,041	0,072	0,000	0,100	0,487	0,036
2	85,6%	2,078	0,348	0,004	0,309	0,036	0,059	0,016	0,074	0,333	0,000
3	85,3%	1,011	0,174	0,002	0,223	0,023	0,038	0,015	0,110	0,491	0,013
4	85,2%	0,875	0,152	0,002	0,273	0,039	0,057	0,000	0,065	0,303	0,052
5	83,7%	1,603	0,311	0,003	0,230	0,043	0,072	0,000	0,092	0,366	0,056
6	87,7%	3,405	0,475	0,002	0,443	0,055	0,070	0,060	0,121	0,431	0,031
7	80,5%	2,418	0,581	0,005	0,409	0,077	0,154	0,020	0,083	0,399	0,000
8	84,4%	1,154	0,212	0,003	0,251	0,042	0,084	0,000	0,073	0,388	0,046
9	82,4%	1,150	0,241	0,007	0,341	0,050	0,134	0,000	0,039	0,208	0,030
10	83,7%	1,017	0,197	0,002	0,259	0,039	0,053	0,000	0,115	0,630	0,022
11	87,2%	1,051	0,153	0,003	0,261	0,030	0,055	0,003	0,074	0,364	0,023
12	80,3%	1,416	0,342	0,008	0,239	0,052	0,144	0,000	0,055	0,332	0,017
13	80,9%	0,946	0,223	0,004	0,157	0,039	0,077	0,000	0,080	0,465	0,048
14	83,3%	1,129	0,224	0,005	0,307	0,047	0,112	0,000	0,038	0,199	0,017
15	80,7%	1,220	0,291	0,006	0,320	0,065	0,150	0,000	0,049	0,359	0,024
16	86,1%	1,815	0,292	0,003	0,383	0,052	0,104	0,000	0,089	0,598	0,028
17	85,5%	1,150	0,197	0,000	0,425	0,066	0,141	0,000	0,061	0,490	0,051
18	82,1%	1,187	0,254	0,006	0,277	0,046	0,119	0,000	0,053	0,392	0,031
19	78,9%	0,845	0,219	0,009	0,236	0,048	0,143	0,000	0,035	0,270	0,018
20	82,2%	0,859	0,185	0,003	0,259	0,041	0,079	0,000	0,048	0,295	0,032

Huésped: Noblesse

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovitexina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0052]

[Ejemplo 4: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado de la *Campanula*, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado de la *Oryza sativa* en la variedad de *Rosa* “*Rita Perfumera*”]

10

El pSPB6188 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 4 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:9) y terminador D8

15

(2) promotor 35S, F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3), y el terminador AT derivado de la *Perilla*

(3) promotor El₂35S, CGT derivado de *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID

NO:5) y un terminador AT derivado de la *Perilla*

(1) promotor El₂35S, FDH derivado de *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 11) y terminador HSP derivado de *Arabidopsis*

5 Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 de la *Campanula*, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT de la *Oryza sativa* y el gen de FDH de la *Oryza sativa* en la planta.

10 El pSPB6188 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa naranja “*Rita Perfumera*” y se obtuvo un total de 77 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 68 acumulaban delfinidina, y el contenido máximo de delfinidina fue del 99,6 % (promedio del 93,3 %). Además, en 57 de los transformantes se confirmó isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima construida por gramo de pétalos frescos fue de 0,72 mg.

[0053]

15 Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 4.

[Tabla 4]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g)
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	
Hués ped	0,0%	0,000	0,009	0,013	0,000	0,019	2,109	0,000	0,000	0,000	IVX 0,000
1	96,8%	1,455	0,048	0,000	0,545	0,115	0,211	0,000	0,015	0,019	0,196
2	96,1%	0,870	0,035	0,000	0,301	0,081	0,258	0,000	0,035	0,069	0,093
3	93,0%	0,647	0,049	0,000	0,450	0,175	0,459	0,000	0,001	0,000	0,050
4	96,8%	1,166	0,039	0,000	0,609	0,143	0,202	0,000	0,002	0,001	0,086
5	97,1%	1,384	0,041	0,000	0,473	0,100	0,134	0,000	0,003	0,000	0,087
6	95,3%	0,632	0,031	0,000	0,387	0,101	0,137	0,000	0,000	0,000	0,037
7	93,9%	1,274	0,083	0,000	0,426	0,166	0,284	0,000	0,003	0,001	0,039
8	95,7%	0,802	0,036	0,000	0,300	0,083	0,100	0,000	0,002	0,000	0,070
9	94,7%	1,522	0,085	0,000	0,526	0,198	0,382	0,000	0,002	0,000	0,033
10	94,4%	1,412	0,084	0,000	0,350	0,152	0,232	0,000	0,002	0,000	0,039
11	93,7%	1,300	0,088	0,000	0,286	0,114	0,175	0,000	0,002	0,001	0,137
12	97,5%	1,842	0,047	0,000	0,589	0,088	0,072	0,000	0,010	0,005	0,042
13	97,5%	1,423	0,037	0,000	0,416	0,066	0,046	0,000	0,010	0,007	0,024
14	95,0%	0,935	0,049	0,000	0,456	0,161	0,302	0,000	0,001	0,000	0,054
15	93,7%	1,272	0,085	0,000	0,509	0,224	0,547	0,000	0,001	0,001	0,063
16	93,2%	0,504	0,037	0,000	0,166	0,063	0,122	0,000	0,000	0,000	0,049
17	93,7%	1,158	0,078	0,000	0,466	0,208	0,652	0,000	0,000	0,000	0,042
18	98,2%	1,152	0,021	0,000	0,514	0,072	0,063	0,000	0,003	0,001	0,098
19	94,8%	1,171	0,065	0,000	0,226	0,072	0,104	0,000	0,002	0,001	0,148
20	90,1%	0,729	0,078	0,002	0,268	0,188	0,760	0,000	0,003	0,006	0,263
21	93,2%	1,120	0,082	0,000	0,449	0,240	0,912	0,000	0,000	0,000	0,034
22	93,9%	1,169	0,076	0,000	0,394	0,168	0,264	0,000	0,002	0,000	0,058
23	98,5%	1,387	0,021	0,000	0,603	0,072	0,051	0,000	0,031	0,026	0,029
24	94,7%	1,319	0,074	0,000	0,604	0,214	0,354	0,000	0,002	0,000	0,062
25	96,9%	1,859	0,060	0,000	0,765	0,169	0,195	0,000	0,003	0,000	0,262
26	75,8%	0,078	0,023	0,002	0,021	0,031	0,548	0,008	0,004	0,089	0,719
27	97,7%	1,847	0,043	0,000	0,404	0,071	0,064	0,003	0,004	0,003	0,226
28	94,4%	0,934	0,056	0,000	0,294	0,110	0,122	0,003	0,002	0,001	0,109
29	94,5%	1,106	0,065	0,000	0,280	0,118	0,122	0,003	0,002	0,002	0,083
30	94,4%	0,621	0,037	0,000	0,294	0,094	0,160	0,001	0,001	0,002	0,066
31	98,5%	1,668	0,026	0,000	0,616	0,072	0,036	0,005	0,010	0,009	0,041
32	98,2%	2,288	0,042	0,000	0,618	0,081	0,077	0,008	0,023	0,022	0,160
33	98,4%	2,080	0,033	0,000	0,525	0,067	0,048	0,005	0,012	0,010	0,142
34	97,2%	1,059	0,031	0,000	0,569	0,108	0,169	0,005	0,011	0,014	0,213
35	98,0%	1,029	0,021	0,000	0,199	0,031	0,028	0,002	0,010	0,009	0,047
36	96,9%	1,338	0,043	0,000	0,252	0,056	0,111	0,004	0,005	0,006	0,165
37	97,7%	1,493	0,035	0,000	0,422	0,078	0,040	0,004	0,006	0,004	0,076
38	95,7%	1,305	0,059	0,000	0,391	0,128	0,105	0,007	0,003	0,002	0,113
39	97,9%	1,199	0,026	0,000	0,280	0,048	0,030	0,004	0,010	0,006	0,035
40	94,7%	1,284	0,072	0,000	0,264	0,090	0,113	0,007	0,002	0,002	0,068
41	94,4%	0,517	0,031	0,000	0,106	0,037	0,042	0,000	0,003	0,002	0,070
42	97,0%	1,734	0,053	0,000	0,867	0,169	0,183	0,007	0,006	0,008	0,076
43	90,6%	0,617	0,064	0,001	0,183	0,097	0,259	0,003	0,001	0,003	0,055
44	97,0%	1,157	0,036	0,000	0,258	0,053	0,038	0,002	0,008	0,006	0,059
45	97,6%	1,662	0,041	0,000	0,382	0,077	0,041	0,001	0,003	0,001	0,125
46	98,2%	1,456	0,026	0,000	0,620	0,083	0,050	0,003	0,005	0,004	0,125
47	97,9%	0,875	0,019	0,000	0,271	0,035	0,018	0,002	0,018	0,013	0,018
48	98,2%	1,281	0,024	0,000	0,171	0,025	0,018	0,001	0,011	0,008	0,048
49	95,1%	1,611	0,083	0,000	0,684	0,235	0,338	0,014	0,002	0,000	0,202
50	93,4%	0,779	0,056	0,000	0,217	0,091	0,125	0,002	0,001	0,002	0,078

Huésped: Rita Perfumera

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovitexina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0054]

[Ejemplo 5: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado de la *Campanula*, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado de la *Oryza sativa* en la variedad de *Rosa* “*Noblesse*”]

- 5 El pSPB6188, que se construyó de la misma manera que para el Ejemplo 4, se introdujo en una variedad de rosa rosa “*Noblesse*” y se obtuvo un total de 51 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que todos acumulaban delfinidina, y el contenido máximo de delfinidina fue del 99,7 % (promedio del 66,9 %). Además, en 48 de los transformantes se confirmó isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima producida
- 10 por gramo de pétalos frescos fue de 0,58 mg.

[0055]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 5.

[Tabla 5]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g)
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	IVX
Hués ped	0,0	0,020	0,040	0,000	0,000	0,012	1,430	0,000	0,000	0,000	0,000
1	97,1	1,312	0,039	0,000	0,382	0,026	0,055	0,008	0,002	0,004	0,553
2	97,0	1,562	0,049	0,000	0,501	0,036	0,085	0,012	0,002	0,004	0,580
3	96,6	1,185	0,042	0,000	0,423	0,030	0,075	0,010	0,002	0,005	0,523
4	76,3	0,522	0,139	0,024	0,100	0,034	0,609	0,044	0,010	0,092	0,033
5	92,9	0,475	0,033	0,003	0,130	0,015	0,104	0,014	0,026	0,111	0,044
6	86,2	0,374	0,055	0,005	0,119	0,029	0,182	0,017	0,016	0,128	0,061
7	73,0	0,244	0,075	0,016	0,029	0,011	0,154	0,011	0,014	0,086	0,020
8	89,9	0,201	0,020	0,003	0,026	0,005	0,046	0,020	0,128	0,264	0,132
9	75,7	0,217	0,060	0,010	0,044	0,017	0,158	0,025	0,074	0,302	0,327
10	89,5	0,881	0,095	0,009	0,057	0,013	0,088	0,007	0,007	0,027	0,252
11	92,0	0,667	0,055	0,004	0,189	0,030	0,182	0,017	0,008	0,028	0,305
12	93,2	0,523	0,035	0,003	0,110	0,015	0,083	0,007	0,013	0,062	0,227
13	66,1	0,211	0,098	0,012	0,053	0,027	0,335	0,018	0,023	0,303	0,104
14	66,5	0,172	0,068	0,020	0,057	0,020	0,362	0,023	0,003	0,049	0,017
15	88,9	0,908	0,101	0,013	0,127	0,025	0,288	0,043	0,117	0,335	0,202
16	51,0	0,120	0,106	0,010	0,023	0,032	0,413	0,023	0,034	0,519	0,130
17	41,3	0,121	0,136	0,037	0,038	0,028	0,926	0,038	0,015	0,348	0,086
18	58,8	0,262	0,165	0,020	0,029	0,035	0,476	0,032	0,039	0,465	0,136
19	96,0	0,888	0,037	0,001	0,425	0,037	0,133	0,013	0,002	0,003	0,266
20	94,9	0,783	0,043	0,000	0,611	0,060	0,287	0,016	0,002	0,006	0,178
21	99,4	0,727	0,004	0,000	0,255	0,004	0,002	0,020	0,091	0,055	0,266
22	99,6	0,860	0,004	0,000	0,258	0,002	0,002	0,027	0,134	0,097	0,123
23	99,7	1,028	0,004	0,000	0,367	0,004	0,002	0,025	0,124	0,093	0,223
24	93,3	0,682	0,049	0,000	0,188	0,009	0,017	0,031	0,165	0,260	0,346
25	99,0	0,861	0,009	0,000	0,397	0,007	0,006	0,023	0,130	0,139	0,151
26	99,6	0,374	0,001	0,000	0,227	0,002	0,001	0,030	0,156	0,142	0,095
27	60,9	0,112	0,067	0,005	0,019	0,016	0,105	0,015	0,118	0,759	0,248
28	91,3	0,941	0,087	0,003	0,354	0,033	0,138	0,014	0,001	0,003	0,234
29	98,2	0,820	0,015	0,000	0,334	0,012	0,023	0,016	0,067	0,074	0,046

Huésped: Noblesse

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovixetina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0056]

[Ejemplo 6: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado del pensamiento, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado del *Lotus japonicus* en la variedad de *Rosa* "Rita

10

Perfumera”]

El pSPB5588 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 4 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado del pensamiento, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:1) y terminador D8

(2) promotor 35S, F2H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3), y el terminador AT derivado de la *Perilla*

(1) promotor 35S, CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:13) y un terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(1) promotor 35S, FDH derivado del *Lotus japonicus*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:15) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 del pensamiento, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y el gen de FDH del *Lotus japonicus* en la planta.

El pSPB5588 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa naranja “*Rita Perfumera*” y se obtuvo un total de 92 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento en 65 de ellos y se confirmó que 44 acumulaban delphinidina, y el contenido máximo de delphinidina fue del 100 % (promedio del 62,3 %). Además, en 37 de los transformantes se confirmó isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue un alto contenido de 2,02 mg.

[0057]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 6.

[Tabla 6]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g) IVX
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	
Hués ped	0,0%	0,000	0,009	0,013	0,000	0,019	2,109	0,000	0,000	0,000	0,000
1	89,3%	0,819	0,097	0,002	0,864	0,289	0,922	0,000	0,000	0,000	0,151
2	90,2%	0,404	0,044	0,001	0,583	0,213	1,008	0,000	0,000	0,000	0,028
3	77,6%	0,116	0,029	0,004	0,120	0,090	2,945	0,000	0,000	0,000	0,291
4	71,7%	0,091	0,033	0,003	0,118	0,092	1,174	0,000	0,000	0,017	0,231
5	70,8%	0,144	0,054	0,006	0,010	0,028	0,387	0,000	0,003	0,025	0,446
6	83,4%	0,655	0,128	0,003	0,547	0,338	1,877	0,000	0,007	0,022	0,368
7	84,9%	0,625	0,111	0,001	0,293	0,146	0,311	0,000	0,007	0,028	0,085
8	100,0%	0,107	0,000	0,000	0,286	0,147	0,510	0,000	0,000	0,000	0,007
9	69,3%	0,055	0,022	0,002	0,039	0,034	0,815	0,000	0,000	0,045	0,127
10	67,6%	0,061	0,026	0,003	0,057	0,049	1,131	0,000	0,000	0,093	0,267
11	46,7%	0,031	0,032	0,004	0,000	0,047	1,150	0,000	0,003	0,070	0,547
12	60,0%	0,052	0,028	0,007	0,029	0,030	1,066	0,000	0,000	0,071	0,188
13	64,6%	0,029	0,013	0,003	0,034	0,031	1,096	0,000	0,000	0,087	0,199
14	68,9%	0,046	0,017	0,003	0,048	0,045	1,489	0,000	0,000	0,082	0,303
15	88,9%	0,769	0,097	0,000	1,066	0,403	1,601	0,000	0,007	0,046	0,091
16	87,0%	1,302	0,194	0,002	0,392	0,140	0,362	0,000	0,000	0,000	0,024
17	49,7%	0,025	0,023	0,002	0,036	0,048	1,097	0,000	0,004	0,141	0,453
18	68,9%	0,091	0,039	0,002	0,065	0,054	0,552	0,000	0,004	0,068	0,239
19	64,8%	0,059	0,027	0,005	0,000	0,049	1,528	0,000	0,000	0,072	0,738
20	87,0%	0,574	0,085	0,001	0,259	0,097	0,213	0,000	0,004	0,010	0,027
21	67,0%	0,037	0,014	0,005	0,041	0,033	1,481	0,000	0,000	0,046	0,075
22	66,3%	0,091	0,040	0,007	0,049	0,052	1,590	0,000	0,000	0,049	0,379
23	86,6%	0,780	0,121	0,001	0,378	0,165	0,306	0,000	0,010	0,029	0,123
24	89,8%	1,128	0,127	0,001	0,432	0,122	0,188	0,000	0,008	0,022	0,108
25	87,0%	0,508	0,075	0,001	0,286	0,107	0,203	0,000	0,008	0,026	0,071
26	92,1%	0,907	0,076	0,002	0,289	0,076	0,131	0,000	0,005	0,011	0,056
27	87,1%	0,758	0,110	0,002	0,260	0,092	0,252	0,000	0,006	0,023	0,211
28	30,8%	0,005	0,007	0,005	0,006	0,019	1,803	0,000	0,000	0,030	0,112
29	64,6%	0,062	0,030	0,004	0,047	0,054	1,794	0,000	0,008	0,183	1,479
30	57,5%	0,037	0,023	0,005	0,020	0,038	1,447	0,000	0,002	0,058	0,408
31	85,1%	0,421	0,073	0,001	0,277	0,120	0,263	0,000	0,008	0,033	0,053
32	51,2%	0,058	0,051	0,003	0,040	0,070	1,003	0,000	0,000	0,117	2,016
33	60,2%	0,070	0,041	0,005	0,050	0,070	1,376	0,000	0,000	0,067	1,027
34	87,3%	1,225	0,176	0,002	0,255	0,138	0,354	0,015	0,010	0,044	0,643

Huésped: Rita Perfumera

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovixetina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0058]

[Ejemplo 7: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado del pensamiento, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT ,modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado del *Lotus japonicus* en la variedad de *Rosa “Noblesse”*]

El pSPB5588, que se construyó de la misma manera que para el Ejemplo 4, se introdujo en una variedad de rosa naranja “*Noblesse*” y se obtuvo un total de 60 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 42 acumulaban delphinidina, y el contenido máximo de delphinidina fue del 96,9 % (promedio del 54,4 %). Además, en 29 de los transformantes se confirmó isovitexina de flavona C-glucósido y la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue un alto contenido de 1,60 mg.

[0059]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 7.

[Tabla 7]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)			Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g)
		Del	Cya	Pel	M	Q	K	Tri	Lut	Api	IVX
Hués ped	0,0%	0,020	0,040	0,000	0,000	0,012	1,430	0,000	0,000	0,000	0,000
1	67,6%	0,372	0,156	0,023	0,074	0,034	0,637	0,000	0,000	0,043	1,398
2	68,2%	0,145	0,051	0,016	0,056	0,024	0,707	0,000	0,000	0,045	0,712
3	55,4%	0,151	0,097	0,025	0,033	0,025	0,739	0,000	0,000	0,120	1,602
4	50,5%	0,174	0,121	0,050	0,035	0,023	0,802	0,000	0,000	0,012	0,333
5	58,9%	0,247	0,131	0,041	0,047	0,027	0,712	0,000	0,000	0,005	0,058
6	69,3%	0,398	0,152	0,025	0,107	0,045	1,008	0,000	0,000	0,029	1,045
7	59,2%	0,283	0,161	0,036	0,059	0,032	1,041	0,000	0,000	0,016	0,655
8	94,2%	0,899	0,056	0,000	0,348	0,030	0,072	0,000	0,002	0,009	0,507
9	54,3%	0,384	0,252	0,070	0,077	0,047	1,075	0,000	0,000	0,000	0,098
10	95,1%	1,580	0,083	0,000	0,426	0,037	0,067	0,000	0,010	0,035	1,015
11	66,5%	0,160	0,068	0,013	0,051	0,025	0,672	0,000	0,000	0,096	1,426
12	90,6%	1,226	0,128	0,001	0,346	0,042	0,101	0,000	0,019	0,086	0,792
13	81,8%	0,649	0,127	0,018	0,192	0,036	0,570	0,000	0,000	0,000	0,241
14	83,5%	0,808	0,148	0,013	0,202	0,044	0,475	0,000	0,000	0,008	0,696
15	86,1%	0,945	0,144	0,011	0,540	0,090	0,913	0,000	0,000	0,021	0,951
16	92,5%	0,981	0,080	0,000	0,592	0,048	0,131	0,000	0,003	0,019	0,264
17	32,2%	0,099	0,140	0,070	0,050	0,039	1,803	0,000	0,000	0,001	0,044
18	60,4%	0,071	0,031	0,015	0,085	0,024	0,829	0,000	0,000	0,000	0,028
19	91,6%	0,689	0,063	0,000	0,523	0,043	0,272	0,000	0,001	0,014	0,195
20	85,3%	0,660	0,104	0,010	0,360	0,047	0,531	0,000	0,001	0,008	0,288
21	89,6%	0,340	0,039	0,001	0,347	0,051	0,383	0,000	0,001	0,012	0,233
22	46,3%	0,179	0,158	0,049	0,066	0,043	1,173	0,004	0,000	0,011	0,158
23	95,6%	1,005	0,047	0,000	0,482	0,022	0,064	0,000	0,009	0,027	0,581
24	96,9%	0,599	0,020	0,000	0,542	0,032	0,071	0,000	0,016	0,087	0,600
25	94,8%	1,168	0,064	0,001	0,686	0,038	0,161	0,000	0,009	0,042	1,124
26	75,8%	0,354	0,085	0,028	0,111	0,029	0,672	0,022	0,001	0,009	0,166
27	77,4%	0,494	0,108	0,036	0,206	0,049	1,572	0,000	0,001	0,024	0,500
28	76,4%	0,194	0,057	0,003	0,105	0,047	0,721	0,037	0,001	0,022	0,355

Huésped: Noblesse

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pel: Pelargonidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, IVX: Isovitexina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0060]

[Ejemplo 8: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H derivado de la *Campanula*, gen de MT derivado de la *Torenia*, gen de F2H derivado de la *Campanula*, gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado del *Lotus japonicus* en la variedad de Rosa “Ocean Song”]

10

El pSPB6486 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 5 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:9) y terminador D8

5 (2) promotor El₂35S, MT derivado de la *Torenia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 17), y terminador NOS

(3) promotor 35S, F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3) y un terminador AT derivado de la *Perilla*

10 (4) promotor 35S, CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:13) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(5) promotor 35S, FDH derivado del *Lotus japonicus*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:15) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

15 Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 de la *Campanula*, el gen de MT de la *Torenia*, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y el gen de FDH del *Lotus japonicus* en la planta.

El pSPB6486 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa de tonalidad azul “*Ocean Song*” y se obtuvo un total de 27 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 26 acumulaban malvidina, y el contenido máximo de malvidina fue del 74,5 % (promedio del 57,0 %). Además, en este sistema, a parte de la isovitexina analizada hasta ahora como la flavona C-glucósido, también se identificaron y cuantificaron vitexina (apigenina 8-C-glucósido), vicenina-2 (apigenina 6,8-C-diglucósido), isoorientina (luteolina 6-C-glucósido) y orientina (luteolina 8-C-glucósido). La flavona C-glucósido se pudo detectar en todos los transformantes en los que se detectó malvidina y de la cantidad total de la misma, la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue un alto contenido de 1,563 mg.

20

25 Además, en la mayoría de los transformantes, la cantidad total de flavona C-glucósido era un alto contenido de 1 mg o más por gramo de pétalos frescos que era aproximadamente 10 veces o más que la cantidad de malvidina producida.

[0061]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación

30 en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Plant a No.	Mal (%)	Antocianidina (mg/g)					Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C-glucósido (mg/g)				
		Del	Cya	Pet	Pel	Mal	M	Q	K	Tri	Lut	Api	Vic2	VX	IVX	Ori	Iori
Hués ped	0,0	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	2,883	0,586	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	70,8	0,024	0,000	0,009	0,000	0,080	1,225	0,077	0,023	0,000	0,013	0,010	0,187	0,205	0,505	0,009	0,073
2	66,2	0,025	0,000	0,007	0,000	0,062	2,453	0,181	0,020	0,009	0,047	0,029	0,743	0,109	0,319	0,027	0,077
3	54,6	0,022	0,006	0,008	0,000	0,050	1,058	1,381	0,515	0,000	0,000	0,000	0,896	0,093	0,219	0,000	0,015
4	52,7	0,020	0,003	0,007	0,000	0,035	0,858	0,482	0,178	0,000	0,003	0,006	0,429	0,174	0,354	0,007	0,035
5	64,0	0,028	0,000	0,009	0,000	0,065	2,045	0,168	0,063	0,000	0,000	0,000	0,586	0,130	0,299	0,002	0,030
6	67,7	0,028	0,000	0,007	0,000	0,074	1,593	0,455	0,115	0,011	0,010	0,009	0,795	0,126	0,355	0,018	0,050
7	72,1	0,027	0,000	0,008	0,000	0,089	2,753	0,526	0,183	0,006	0,004	0,004	0,905	0,093	0,262	0,000	0,028
8	54,7	0,019	0,007	0,005	0,000	0,049	1,010	2,128	0,418	0,018	0,002	0,005	0,945	0,226	0,325	0,000	0,021
9	39,1	0,018	0,009	0,004	0,000	0,025	0,679	1,438	0,322	0,005	0,002	0,002	0,672	0,246	0,283	0,007	0,020
10	39,8	0,013	0,009	0,005	0,000	0,021	0,447	1,129	0,586	0,000	0,000	0,002	0,432	0,080	0,179	0,000	0,010
11	45,9	0,011	0,011	0,006	0,000	0,034	0,914	3,471	1,481	0,000	0,000	0,000	0,839	0,050	0,118	0,000	0,003
12	45,4	0,022	0,005	0,007	0,000	0,032	0,803	0,992	0,418	0,000	0,004	0,005	0,511	0,142	0,354	0,000	0,024
13	62,8	0,032	0,000	0,008	0,000	0,067	1,830	0,210	0,059	0,018	0,023	0,015	0,910	0,000	0,249	0,000	0,049
14	65,6	0,024	0,000	0,007	0,000	0,060	1,942	0,258	0,078	0,011	0,019	0,015	1,047	0,056	0,305	0,016	0,054
15	52,9	0,042	0,002	0,009	0,000	0,062	0,993	0,377	0,100	0,000	0,004	0,005	0,396	0,197	0,450	0,000	0,050
16	63,9	0,031	0,000	0,007	0,000	0,067	2,742	0,221	0,056	0,009	0,030	0,018	0,591	0,063	0,285	0,022	0,058
17	63,5	0,016	0,000	0,005	0,000	0,037	1,767	0,102	0,013	0,009	0,051	0,029	0,621	0,147	0,242	0,022	0,061
18	74,5	0,029	0,000	0,009	0,000	0,109	2,078	0,187	0,029	0,017	0,030	0,015	0,604	0,051	0,276	0,021	0,061
19	55,4	0,019	0,009	0,006	0,000	0,059	0,937	1,893	0,502	0,008	0,001	0,000	1,002	0,078	0,218	0,000	0,007
20	38,5	0,006	0,010	0,002	0,000	0,019	0,480	2,621	0,468	0,007	0,001	0,003	0,890	0,147	0,247	0,000	0,012
21	47,7	0,025	0,000	0,009	0,000	0,031	2,684	0,376	0,102	0,008	0,019	0,018	0,700	0,147	0,303	0,017	0,048
22	39,5	0,011	0,013	0,003	0,000	0,026	0,497	2,333	0,524	0,000	0,004	0,008	0,720	0,224	0,346	0,009	0,030
23	65,3	0,019	0,001	0,007	0,000	0,055	1,615	1,007	0,223	0,005	0,001	0,000	0,828	0,101	0,207	0,000	0,013
24	70,0	0,028	0,000	0,008	0,000	0,087	2,776	0,531	0,166	0,000	0,001	0,000	0,913	0,055	0,178	0,000	0,012
25	66,2	0,014	0,003	0,007	0,000	0,058	1,428	1,898	0,525	0,000	0,008	0,014	0,907	0,255	0,368	0,000	0,034
26	42,7	0,036	0,017	0,011	0,000	0,063	0,991	2,495	0,457	0,000	0,000	0,000	0,529	0,030	0,094	0,000	0,000

Huésped: Ocean Song

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pet: Petunidina, Pel: Pelargonidina, Mal: Malvidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, Vic2: Vicenina-2, VX: Vitexina, IVX:

Isovitexina, Ori: Orientina, Iori: Isoorientina

Mal (%): Porcentaje de malvidina de todas las antocianidinas

[0062]

[Ejemplo 9: (Vía 2) Introducción del gen F3'5'H#40 derivado del pensamiento, gen de MT

10 derivado de la *Torenia*, gen de FNS derivado de la *Torenia*, gen de CGT derivado de la *Gentiana scabra* en la variedad de *Rosa "Rita Perfumera"]*

El pSPB6438 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 4 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado del pensamiento, ADNc de longitud completa (SEQ ID

15 NO: 1) y terminador NOS

(2) promotor El₂35S, gen de MT derivado de la *Torenia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID

NO: 17) y terminador NOS

(3) promotor El₂35S, gen de FNS derivado de la *Torenia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 19) y terminador D8

(2) promotor El₂35S, CGT derivado de la *Gentiana scabra*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 21) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

5 Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 del pensamiento, el gen de MT de la *Torenia*, el gen de FNS de la *Torenia* y el gen de CGT de la *Gentiana scabra*.

 El pSPB6438 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa naranja “*Rita Perfumera*” y se obtuvo un total de 122 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 71 transformantes acumulaban malvidina, y el contenido máximo de malvidina fue del 69,6 % (promedio del 25,9 %). Además, en este sistema, a parte de la isovitexina analizada hasta ahora como la flavona C-glucósido, también se identificaron y cuantificaron vitexina (apigenina 8-C-glucósido) y vicenina-2 (apigenina 6,8-C-diglucósido). De los transformantes en los que se pudo detectar malvidina, se pudo confirmar flavona C-glucósido en 16 de ellos, y de la cantidad total de los mismos, la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue de 0,02 mg. En contraste con esto, la cantidad total de flavonas (apigenina, luteolina y tricetina) fue un alto contenido de 2,07 mg por gramo de pétalos frescos.

[0063]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 9.

[Tabla 9]

Plant a No.	Mal (%)	Antocianidina (mg/g)					Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C- glucósido (mg/g)		
		Del	Cya	Pet	Pel	Mal	M	Q	K	Tri	Lut	Api	Vic2	VX	IVX
Hués ped	0,0	0,000	0,009	0,000	0,013	0,000	0,000	0,019	2,109	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	39,3	0,051	0,013	0,040	0,002	0,078	0,177	0,099	0,471	0,626	0,258	0,208	0,007	0,000	0,000
2	33,0	0,094	0,026	0,068	0,004	0,106	0,243	0,130	0,654	0,824	0,311	0,227	0,009	0,000	0,000
3	62,5	0,104	0,022	0,071	0,003	0,397	0,465	0,232	0,684	1,105	0,327	0,170	0,009	0,000	0,000
4	69,9	0,044	0,010	0,038	0,003	0,315	0,343	0,190	0,649	0,730	0,336	0,194	0,007	0,000	0,000
5	32,7	0,095	0,021	0,068	0,002	0,099	0,257	0,123	0,532	1,032	0,345	0,282	0,013	0,000	0,000
6	27,0	0,099	0,021	0,062	0,002	0,073	0,203	0,086	0,496	1,151	0,414	0,502	0,015	0,000	0,000
7	33,9	0,070	0,019	0,052	0,003	0,083	0,251	0,117	0,616	0,790	0,309	0,257	0,010	0,000	0,000
8	28,6	0,056	0,018	0,038	0,001	0,049	0,175	0,079	0,231	1,065	0,414	0,314	0,018	0,000	0,000
9	15,2	0,006	0,005	0,003	0,004	0,004	0,023	0,025	0,972	0,000	0,063	0,624	0,008	0,000	0,004
10	19,0	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,027	0,030	1,517	0,093	0,049	0,598	0,005	0,000	0,007
11	10,5	0,002	0,004	0,001	0,006	0,002	0,007	0,022	1,891	0,079	0,045	0,790	0,006	0,000	0,008
12	30,5	0,037	0,011	0,026	0,001	0,037	0,135	0,065	0,251	0,565	0,243	0,205	0,009	0,000	0,000
13	55,7	0,023	0,008	0,020	0,000	0,080	0,093	0,088	0,144	0,276	0,243	0,241	0,009	0,000	0,000
14	37,0	0,065	0,029	0,051	0,002	0,105	0,191	0,147	0,348	0,640	0,341	0,181	0,013	0,000	0,000
15	40,5	0,072	0,021	0,059	0,002	0,123	0,249	0,148	0,530	0,749	0,317	0,225	0,010	0,000	0,000
16	17,4	0,003	0,004	0,000	0,003	0,002	0,013	0,023	0,828	0,050	0,041	0,739	0,009	0,000	0,006

Huésped: Rita Perfumera

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pet: Petunidina, Pel: Pelargonidina, Mal: Malvidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

- 5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, Vic2: Vicenina-2, VX: Vitexina, IVX: Isovitexina
Mal (%): Porcentaje de malvidina de todas las antocianidinas

[0064]

[Ejemplo 10: (Vía 2) Introducción del gen F3'5"H derivado de la *Campanula*, gen de MT derivado de la *Torenia*, gen de FNS derivado de la *Torenia* y gen de CGT derivado de la *Gentiana scabra* en la variedad de *Rosa* "Ocean Song"]

El pSPB7013 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 4 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5"H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:9) y terminador D8

- 15 (2) promotor El₂35S, MT derivado de la *Torenia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 17) y terminador NOS

(3) promotor El₂35S, FNS derivado de la *Torenia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 19) y un terminador D8

- 20 (4) promotor El₂35S, CGT derivado de la *Gentiana scabra*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 21) (5'-UTR derivado del gen de ADH de la *Arabidopsis* (SEQ ID NO: 23) agregado al extremo 5') y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 de la *Campanula*, el gen de MT de la *Torenia*, el gen de FNS de la *Torenia* y el gen de CGT de la *Gentiana scabra*.

El pSPB7013 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa de tonalidad azul “*Ocean Song*” y se obtuvo un total de 15 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que todos los transformantes acumulaban malvidina, y el contenido máximo de malvidina fue del 67,2 % (promedio del 40,9 %). Además, en este sistema, a parte de la isovitexina, vitexina y vicenina-2 analizadas hasta ahora como la flavona C-glucósido, también se identificaron y cuantificaron isoorientina (luteolina 6-C-glucósido) y orientina (luteolina 8-C-glucósido). La flavona C-glucósido se pudo detectar en todos los transformantes en los que se detectó malvidina y de la cantidad total de la misma, la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos fue un alto contenido de 1,410 mg.

[0065]

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 10.

[Tabla 10]

Plant a No.	Mal (%)	Antocianidina (mg/g)					Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C-glucósido (mg/g)				
		Del	Cya	Pet	Pel	Mal	M	Q	K	Tri	Lut	Api	Vic2	VX	IVX	Ori	Iori
Huésped	0,0	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	2,883	0,586	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	42,0	0,011	0,000	0,005	0,000	0,012	1,108	0,258	0,091	0,899	0,433	0,042	0,010	0,000	0,479	0,000	0,921
2	41,3	0,012	0,000	0,006	0,000	0,013	1,178	0,347	0,113	0,822	0,401	0,037	0,009	0,000	0,337	0,000	0,731
3	32,4	0,014	0,000	0,005	0,000	0,010	0,956	0,328	0,082	0,892	0,473	0,035	0,010	0,000	0,159	0,000	0,619
4	44,5	0,013	0,001	0,007	0,000	0,018	1,338	0,447	0,105	0,680	0,361	0,031	0,008	0,000	0,349	0,000	0,777
5	38,5	0,014	0,007	0,006	0,000	0,024	0,619	1,582	0,278	0,033	0,023	0,004	0,000	0,000	0,014	0,000	0,087
6	41,5	0,042	0,002	0,022	0,000	0,048	3,590	1,293	0,598	0,063	0,038	0,005	0,000	0,000	0,003	0,000	0,075
7	44,4	0,017	0,000	0,009	0,000	0,023	0,959	0,369	0,052	0,795	0,416	0,030	0,017	0,000	0,224	0,000	0,884
8	40,4	0,037	0,002	0,016	0,000	0,039	3,619	1,467	0,621	0,028	0,011	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026
9	32,0	0,050	0,002	0,017	0,000	0,033	1,968	0,635	0,089	0,031	0,018	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033
10	41,8	0,048	0,003	0,022	0,000	0,056	3,123	1,343	0,400	0,040	0,013	0,001	0,000	0,000	0,002	0,000	0,031
11	40,3	0,016	0,000	0,006	0,000	0,015	1,076	0,285	0,099	0,652	0,328	0,026	0,012	0,000	0,108	0,000	0,488
12	36,3	0,038	0,000	0,012	0,000	0,028	1,330	0,308	0,088	0,226	0,129	0,012	0,000	0,000	0,022	0,000	0,175
13	33,3	0,045	0,001	0,017	0,000	0,032	2,311	0,547	0,151	0,049	0,015	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036
14	67,2	0,038	0,000	0,011	0,000	0,099	2,892	0,767	0,224	0,064	0,037	0,005	0,000	0,000	0,010	0,000	0,071
15	38,3	0,013	0,000	0,005	0,000	0,012	0,688	0,234	0,031	0,658	0,409	0,028	0,014	0,000	0,135	0,000	0,622

Huésped: Ocean Song

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pet: Petunidina, Pel: Pelargonidina, Mal: Malvidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, Vic2: Vicenina-2, VX: Vitexina, IVX: Isovitexina

Ori: Orientina, Iori: Isoorientina

Mal (%): Porcentaje de malvidina de todas las antocianidinas

[0066]

[Ejemplo 11: Evaluación del color de flor de las rosas que contienen flavona C-glucósido]

Los transformantes (variedad de rosa “*Ocean Song*” utilizada como huésped) creados en

los Ejemplos 8 y 10 se clasificaron en grupos, en donde: (1) la delfinidina se había acumulado como el pigmento principal pero la flavona no estaba presente; (2) la malvidina se había acumulado como pigmento principal y la flavona C-glucósido creada a través de la vía 1 estaba presente; (3) la malvidina se había acumulado como pigmento principal y la flavona C-glucósido creada a través de la vía 2 estaba presente; y el huésped (en donde la cianidina se había acumulado como pigmento principal). El color de cada uno de sus pétalos se midió con el uso de un espectrofotómetro CM-2022 (Minolta Co., Ltd) con un campo de visión de 10 grados y una fuente de luz D65 y se analizó con el uso del software de gestión del color SpectraMagic TM (Minolta Co., Ltd.) (n=5).

Incluso en los tipos de rosa en los que el pigmento principal era delfinidina, el ángulo de tonalidad de los pétalos se desplazó hacia el azul. Además, cuando se hizo que la flavona C-glucósido coexistiera en tipos de rosas en los que el pigmento principal era la malvidina, esta tendencia fue aún más notable y el ángulo de tonalidad también se desplazó en gran medida hacia el lado azul. Se encontró que el sistema del Ejemplo 10 exhibía tal tendencia notable. A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el color de los pétalos se volvió más azul debido a la coexistencia de malvidina y flavona C-glucósido.

Los resultados se muestran en la Tabla 11.

[0067]

[Tabla 11]

	Combinación de genes y flavonoides	Ángulo de tonalidad
Huésped	Ocean Song Cianidina acumulada como pigmento principal Sin contenido de flavona C-glucósido en absoluto	Promedio 362,57°
	1. F3'5'H de <i>Campanula</i> Alta acumulación de delfinidina como pigmento principal Sin contenido de flavona C-glucósido en absoluto	Promedio 337,33° Valor máximo de azul 333,15°
Ejemplo 8	2. F3'5'H de <i>Campanula</i> + MT de <i>Torenia</i> + F2H de <i>Glycyrrhiza</i> + CGT de <i>Oryza sativa</i> (modificado con el uso de codones) + FDH de <i>Lotus japonicus</i> Alta acumulación de malvidina como pigmento principal Con contenido de flavona C-glucósido	Promedio 320,16° Valor máximo de azul 318,89°
Ejemplo 10	3. F3'5'H de <i>Campanula</i> + MT de <i>Torenia</i> + FNS de <i>Torenia</i> + CGT de <i>Gentiana scabra</i> Alta acumulación de malvidina como pigmento principal Con contenido de flavona C-glucósido	Promedio 313,75° Valor máximo de azul 277,05°

[0068]

[Ejemplo 12: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H derivado de la *Campanula*, gen de 3AT

derivado de la *lavanda*, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH derivado del *Lotus japonicus* en la variedad de *Rosa* “Ocean Song”]

El pSPB6495 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 5 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 9) y terminador D8

(2) promotor El₂35S, 3AT derivado de la *lavanda*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 24) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(3) promotor 35S, gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3) y terminador AT derivado de la *Perilla*

(4) promotor 35S, CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 13) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(5) promotor 35S, FDH derivado del *Lotus japonicus*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 15) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H#40 de la *Campanula*, el gen de 3AT de la *Lavanda*, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y el gen de FDH del *Lotus japonicus* en la planta.

El pSPB6495 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa azul “Ocean Song” y se obtuvo un total de 228 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y se confirmó que 59 transformantes acumulaban delfinidina acilada. Además, en este sistema, a parte de la isovitexina analizada hasta ahora como la flavona C-glucósido, también se identificaron y cuantificaron vitexina (apigenina 8-C-glucósido), vicienina-2 (apigenina 6,8-C-diglucósido), isoorientina (luteolina 6-C-glucósido) y orientina (luteolina 8-C-glucósido). La flavona C-glucósido se pudo detectar en todos los transformantes en los que se detectó delfinidina acilada. Hubo un transformante que tenía una cantidad máxima alta de la misma, tan alta como la cantidad total de la misma, la cantidad máxima producida por gramo de pétalos frescos incluía un transformante con un alto contenido de 1,720 mg, pero el valor promedio era de 0,833 mg.

Los valores de análisis representativos de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 12.

[0069]

[Tabla 12]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)					Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C-glucósido (mg/g)				
		Del	Cya	Pet	Pel	Mal	M	Q	K	Tri	Lut	Api	Vic2	VX	IVX	Ori	Iori
1	94,6	0,126	0,007	0,000	0,000	0,000	1,140	0,476	0,056	0,008	0,004	0,002	0,508	0,030	0,088	0,000	0,011
2	94,7	0,078	0,004	0,000	0,000	0,000	1,864	1,082	0,524	0,000	0,000	0,000	0,320	0,000	0,022	0,000	0,000
3	92,4	0,135	0,011	0,001	0,000	0,000	2,853	2,384	1,236	0,000	0,000	0,000	0,745	0,014	0,049	0,000	0,000
4	92,3	0,082	0,007	0,000	0,000	0,000	1,574	0,922	0,165	0,000	0,002	0,002	0,746	0,043	0,094	0,000	0,011
5	92,7	0,077	0,006	0,001	0,000	0,000	1,398	0,700	0,142	0,000	0,000	0,000	0,575	0,033	0,102	0,000	0,012
6	93,6	0,117	0,008	0,000	0,000	0,000	1,683	0,934	0,131	0,000	0,001	0,001	0,779	0,034	0,105	0,000	0,014
7	92,9	0,091	0,007	0,001	0,000	0,000	1,415	0,637	0,086	0,000	0,001	0,000	0,637	0,027	0,059	0,000	0,007
8	92,1	0,090	0,008	0,001	0,000	0,000	1,121	0,692	0,147	0,000	0,000	0,000	0,461	0,015	0,060	0,000	0,000
9	91,7	0,096	0,009	0,000	0,000	0,000	2,380	1,311	0,296	0,006	0,005	0,010	0,594	0,065	0,139	0,000	0,015
10	94,1	0,098	0,006	0,001	0,000	0,000	2,300	1,122	0,241	0,000	0,001	0,000	0,698	0,030	0,096	0,000	0,009
11	95,7	0,093	0,004	0,000	0,000	0,000	1,765	0,703	0,120	0,000	0,008	0,010	0,654	0,030	0,103	0,000	0,015
12	95,8	0,078	0,003	0,000	0,000	0,000	1,783	0,682	0,126	0,000	0,007	0,011	0,614	0,041	0,117	0,000	0,016
13	100,0	0,073	0,000	0,000	0,000	0,000	2,114	0,320	0,041	0,000	0,010	0,007	0,405	0,052	0,126	0,000	0,023
14	100,0	0,076	0,000	0,000	0,000	0,000	2,593	0,267	0,037	0,000	0,032	0,025	0,636	0,174	0,346	0,019	0,064
15	100,0	0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	2,262	0,301	0,049	0,000	0,032	0,022	0,710	0,122	0,317	0,017	0,060
16	93,9	0,072	0,005	0,001	0,000	0,000	1,373	0,583	0,093	0,000	0,000	0,000	0,573	0,020	0,065	0,000	0,006
17	91,4	0,094	0,009	0,001	0,000	0,000	1,236	0,734	0,087	0,000	0,000	0,000	0,485	0,015	0,048	0,000	0,000
18	97,4	0,100	0,003	0,001	0,000	0,000	1,764	0,808	0,302	0,000	0,000	0,000	0,481	0,013	0,082	0,000	0,006
19	95,6	0,097	0,005	0,000	0,000	0,000	2,792	1,657	0,410	0,000	0,008	0,015	0,575	0,029	0,117	0,000	0,014
20	97,2	0,088	0,003	0,001	0,000	0,000	1,858	0,573	0,131	0,000	0,001	0,001	0,763	0,018	0,069	0,000	0,009
21	96,9	0,101	0,003	0,001	0,000	0,000	2,990	1,293	0,424	0,000	0,001	0,000	0,846	0,017	0,093	0,000	0,007
22	96,8	0,090	0,003	0,001	0,000	0,000	2,171	0,728	0,173	0,000	0,000	0,000	0,662	0,011	0,047	0,000	0,000
23	96,6	0,100	0,003	0,000	0,000	0,000	3,097	1,561	0,484	0,000	0,008	0,019	0,650	0,026	0,103	0,000	0,010
24	93,6	0,073	0,005	0,000	0,000	0,000	1,506	0,687	0,074	0,000	0,000	0,000	0,633	0,020	0,058	0,000	0,006
25	93,4	0,074	0,005	0,000	0,000	0,000	1,292	0,683	0,075	0,000	0,004	0,003	0,491	0,017	0,055	0,000	0,007
26	90,2	0,093	0,010	0,000	0,000	0,000	2,371	1,426	0,279	0,000	0,001	0,000	0,777	0,021	0,071	0,000	0,004
27	90,3	0,104	0,011	0,000	0,000	0,000	1,766	1,172	0,190	0,000	0,001	0,000	0,786	0,020	0,055	0,000	0,004
28	90,8	0,100	0,010	0,001	0,000	0,000	2,273	1,494	0,278	0,000	0,001	0,000	0,760	0,024	0,078	0,000	0,006
29	91,2	0,097	0,009	0,000	0,000	0,000	1,680	1,113	0,225	0,000	0,000	0,000	0,579	0,012	0,035	0,000	0,004
30	94,0	0,099	0,006	0,000	0,000	0,000	1,623	0,941	0,184	0,000	0,001	0,000	0,811	0,024	0,070	0,000	0,007
31	92,0	0,091	0,008	0,001	0,000	0,000	1,379	0,814	0,116	0,000	0,002	0,000	0,749	0,019	0,073	0,000	0,007
32	92,2	0,088	0,008	0,001	0,000	0,000	1,402	0,767	0,102	0,000	0,001	0,000	0,880	0,023	0,085	0,000	0,007
33	93,2	0,072	0,005	0,001	0,000	0,000	1,919	1,105	0,302	0,000	0,001	0,000	0,707	0,026	0,086	0,000	0,006
34	93,4	0,104	0,007	0,001	0,000	0,000	1,572	0,781	0,103	0,000	0,002	0,000	0,900	0,047	0,158	0,000	0,017
35	91,4	0,099	0,009	0,000	0,000	0,000	1,550	1,028	0,160	0,000	0,008	0,009	0,752	0,047	0,166	0,000	0,020
36	90,9	0,113	0,011	0,001	0,000	0,000	1,607	1,118	0,212	0,000	0,000	0,000	0,752	0,014	0,072	0,000	0,000
37	95,7	0,067	0,003	0,000	0,000	0,000	1,938	0,695	0,123	0,000	0,010	0,016	0,706	0,071	0,156	0,000	0,020
38	91,1	0,089	0,009	0,001	0,000	0,000	2,127	1,346	0,263	0,000	0,011	0,015	0,693	0,069	0,151	0,000	0,016
39	96,0	0,097	0,004	0,000	0,000	0,000	2,271	1,100	0,244	0,000	0,003	0,005	0,560	0,021	0,063	0,000	0,005
40	95,2	0,094	0,005	0,000	0,000	0,000	1,396	0,541	0,105	0,000	0,012	0,014	0,540	0,120	0,338	0,000	0,040
41	97,7	0,076	0,002	0,000	0,000	0,000	2,413	0,859	0,236	0,011	0,013	0,023	0,590	0,019	0,073	0,000	0,010
42	100,0	0,074	0,000	0,000	0,000	0,000	1,947	0,358	0,072	0,000	0,007	0,007	0,618	0,043	0,121	0,000	0,023
43	94,7	0,069	0,004	0,000	0,000	0,000	1,621	0,692	0,146	0,000	0,001	0,000	0,704	0,015	0,055	0,000	0,000
44	93,9	0,081	0,005	0,001	0,000	0,000	1,528	0,648	0,093	0,000	0,001	0,000	0,586	0,017	0,054	0,000	0,000
45	95,6	0,078	0,004	0,000	0,000	0,000	1,692	0,672	0,156	0,000	0,001	0,000	0,673	0,021	0,055	0,000	0,007
46	95,2	0,112	0,006	0,000	0,000	0,000	1,958	0,851	0,202	0,000	0,000	0,000	0,794	0,023	0,069	0,000	0,007
47	97,4	0,106	0,003	0,001	0,000	0,000	3,277	1,210	0,472	0,000	0,000	0,000	0,661	0,018	0,085	0,000	0,007
48	97,5	0,120	0,003	0,000	0,000	0,000	2,848	1,063	0,341	0,000	0,001	0,000	0,976	0,016	0,095	0,000	0,010
49	94,8	0,130	0,007	0,001	0,000	0,000	1,815	0,798	0,146	0,000	0,000	0,000	0,855	0,020	0,086	0,000	0,010
50	91,1	0,074	0,007	0,001	0,000	0,000	1,620	0,907	0,163	0,000	0,001	0,000	0,640	0,015	0,047	0,000	0,000
51	91,2	0,085	0,008	0,000	0,000	0,000	2,123	1,204	0,163	0,000	0,001	0,001	0,665	0,037	0,092	0,000	0,009
52	92,5	0,091	0,007	0,000	0,000	0,000	1,908	1,074	0,238	0,000	0,001	0,000	0,638	0,025	0,052	0,000	0,005
53	93,1	0,097	0,007	0,000	0,000	0,000	2,411	1,360	0,322	0,000	0,000	0,000	0,701	0,028	0,048	0,000	0,000
54	100,0	0,052	0,000	0,000	0,000	0,000	3,621	0,476	0,106	0,000	0,000	0,000	1,148	0,216	0,325	0,000	0,031

Huésped: Ocean Song

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pet: Petunidina, Pel: Pelargonidina, Mal: Malvidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

5 Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, Vic2: Vicenina-2, VX: Vitexina, IVX:

Isovitexina, Ori: Orientina, Iori: Isoorientina

Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0070]

[Ejemplo 13: (Vía 1) Introducción del gen F3'5'H derivado de la *Campanula*, gen 3'5'GT derivado de la *Clitoria ternatea*, gen 53GT (ARNi) derivado de la *Rosa*, gen 3GT derivado de la *Perilla*, gen 3 malonil transferasa derivado de la *Dahlia* (MaT), gen de F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, gen de CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa* y gen de FDH del *Lotus japonicus* en la variedad de *Rosa* “*Ocean Song*”]

El pSPB7189 tiene el esqueleto básico de pBINPLUS y contiene los siguientes 5 casetes de expresión.

(1) promotor El₂35S, F3'5'H derivado de la *Campanula*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO:9) y terminador NOS

(2) promotor El₂35S, A3'5'GT derivado de la *Clitoria*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 26) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(3) promotor El₂35S, 53GT derivado de la *Rosa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 28) (ARNi) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(4) promotor SAT, 3GT derivado de la *Perilla*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 30) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(5) promotor El₂35S, 3MaT derivado de la *Dahlia*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 32) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(6) promotor 35S, F2H derivado de la *Glycyrrhiza*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 3) y terminador AT derivado de la *Perilla*

(7) promotor 35S, CGT, modificado con el uso de codones, derivado de la *Oryza sativa*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 13) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

(8) promotor 35S, FDH derivado del *Lotus japonicus*, ADNc de longitud completa (SEQ ID NO: 15) y terminador HSP derivado de la *Arabidopsis*

Este plásmido expresa constitutivamente el gen F3'5'H de la *Campanula*, el gen A3',5'Gt de la *Clitoria ternatea*, el gen 3GT de la *Perilla*, el gen 3MaT de la *Dahlia*, el gen de F2H de la *Glycyrrhiza*, el gen de CGT, modificado con el uso de codones, de la *Oryza sativa* y el gen de FDH del *Lotus japonicus* e inhibe la expresión del gen 5,3GT endógeno de la *Rosa* en plantas.

El pSPB7189 construido de esta manera se introdujo en una variedad de rosa de tonalidad azul “*Ocean Song*” y se obtuvo un total de 101 transformantes. Se llevó a cabo un análisis de pigmento y solo se confirmó que 1 transformante acumulaba delfinidina, y no se confirmó su acilación. Además, en este sistema, a parte de la isovitexina utilizada hasta ahora como la flavona C-glucósido, también se identificaron y cuantificaron vitexina (apigenina 8-C-glucósido), vicenina-2 (apigenina 6,8-C-diglucósido), isoorientina (luteolina 6-C-glucósido) y orientina (luteolina 8-C-glucósido). Se pudo detectar flavona C-glucósido en este transformante, y de la cantidad total de la misma, la cantidad producida por gramo de pétalos frescos fue un alto

contenido de 1,024 mg.

Los valores analizados de los transformantes se muestran a continuación en la Tabla 13.

[0071]

[Tabla 13]

Plant a No.	Del (%)	Antocianidina (mg/g)					Flavonol (mg/g)			Flavona (mg/g)			Flavona C-glucósido (mg/g)				
		Del	Cya	Pet	Pel	Mal	M	Q	K	Tri	Lut	Api	Vic2	VX	IVX	Ori	Iori
1	100,0	0,068	0,000	0,000	0,000	0,000	2,522	0,321	0,122	0,012	0,010	0,016	0,607	0,135	0,225	0,012	0,045

5 Huésped: Ocean Song

Del: Delfinidina, Cya: Cianidina, Pet: Petunidina, Pel: Pelargonidina, Mal: Malvidina

M: Miricetina, Q: Quercetina, K: Kaempferol

Tri: Tricetina, Lut: Luteolina, Api: Apigenina, Vic2: Vicenina-2, VX: Vitexina, IVX:

Isovitexina, Ori: Orientina, Iori: Isoorientina

10 Del (%): Porcentaje de delfinidina de todas las antocianidinas

[0072]

[Ejemplo 14: Evaluación del color de flor de las rosas que contienen flavona C-glucósido]

Los transformantes (variedad de rosa “*Ocean Song*” utilizada como huésped) creados en los Ejemplos 12 y 13 se clasificaron en grupos, en donde: (1) la delfinidina (una porción de la cual fue acilada) se acumuló a medida que el pigmento principal y la flavona C-glucósido se creaba a través de la vía 1; y (2) la delfinidina se acumuló a medida que el pigmento principal y la flavona C-glucósido se creaba a través de la vía 1. El color de cada pétalo se midió con el uso de un espectrofotómetro CM-2022 (Minolta Co., Ltd) con un campo de visión de 10 grados y una fuente de luz D65 y se analizó con el uso del software de gestión del color SpectraMagic TM (Minolta Co., Ltd.) (n=5).

Para los tipos de rosa en los que el pigmento principal era delfinidina, incluso si una porción de la misma estaba acilada, no se confirmó que el ángulo de tonalidad de los pétalos haya cambiado hacia el azul en comparación con los transformantes creados en los Ejemplos 8 y 10 (sin embargo, hubo un desplazamiento mayor del azul que en la antocianina acilada sola). A partir de los resultados anteriores, se confirmó que el color de los pétalos se volvió más azul debido a la coexistencia de malvidina y flavona C-glucósido.

Los resultados se muestran en la Tabla 14.

[0073]

[Tabla 14]

	Combinación de genes y flavonoides	Ángulo de tonalidad
Ejemplo 12	4. F3'5'H de <i>Campanula</i> + 3AT de <i>Lavanda</i> + F2H de <i>Glycyrrhiza</i> + CGT de <i>Oryza sativa</i> (modificado con el uso de codones) + FDH de <i>Lotus japonicus</i> Delfinidina (una porción de la cual está acilada) acumulada como pigmento principal, con contenido de flavona C-glucósido	Promedio 332,56° Valor máximo de azul 329,42°
Ejemplo 13	5. F3'5'H de <i>Campanula</i> + A3'5'GT de <i>Clitoria ternatea</i> + 5,3GT (ARNi) de <i>Rosa</i> + 3GT de <i>Perilla</i> + 3MaT de <i>Dahlia</i> + F2H de <i>Glycyrrhiza</i> + CGT de <i>Oryza sativa</i> (modificado con el uso de codones) + FDH de <i>Lotus japonicus</i> Delfinidina acumulada como pigmento principal, con contenido de flavona C-glucósido	342,66°

LISTADO DE SECUENCIAS